

## Citometría de flujo en pacientes con anemia hemolítica autoinmune caliente con prueba de Coombs negativa

Flow cytometry in patients with warm autoimmune hemolytic anemia with a negative Coombs test

Yisenia Romero Díaz<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0472-4404>

Mariela Forrellat Barrios<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1590-9191>

Alexis Morán Fernández<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9489-1072>

<sup>1</sup> Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba,

<sup>2</sup> Hospital Pediátrico Docente Juan Manuel Márquez, La Habana, Cuba

\*Autor para correspondencia: (yisi2801@gmail.com )

### RESUMEN:

**Introducción:** La anemia hemolítica autoinmune es una enfermedad caracterizada por la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios propios del paciente. El diagnóstico inmunohematológico se basa fundamentalmente en la evidencia de autoanticuerpos en los eritrocitos mediante la prueba de antiglobulina directa (PAD); sin embargo, en ocasiones esta resulta negativa.

**Objetivo:** Aplicar la técnica de citometría de flujo al diagnóstico de las anemias hemolíticas autoinmunes caliente con PAD negativa en el Instituto de Hematología e Inmunología.

**Métodos:** Se realizó un estudio exploratorio, transversal de tipo investigación desarrollo y evaluación de tecnología. Se analizó la suspensión de eritrocitos de 72 pacientes con sospecha de anemia hemolítica autoinmune, en el Instituto de Hematología e Inmunología entre 2020 y 2024.

**Resultado:** De las 72 muestras estudiadas, 35 (48,6 %) correspondían al sexo femenino y 37 (51,4 %) al sexo masculino. Se detectaron autoanticuerpos en 39 muestras, 54,16 % del total estudiado, de ellas 28 presentaron fluorescencia para el isotipo IgG, 8 para el isotipo IgM y 3 para el isotipo IgA.

**Conclusiones:** La citometría de flujo es una herramienta que proporciona certeza en el diagnóstico de las anemias hemolíticas autoinmunes caliente PAD negativa, la que usualmente es un desafío para el diagnóstico clásico.

**Palabras clave:** citometría de flujo; anemias hemolíticas autoinmune caliente; prueba antiglobulina directa

## ABSTRACT

**Introduction:** Autoimmune hemolytic anemia is a disease characterized by the presence of antibodies directed against the patient's own red blood cell antigens. Immunohematological diagnosis is primarily based on evidence of autoantibodies in red blood cells using the direct antiglobulin test (DAT); however, this test is occasionally negative.

**Objective:** To apply flow cytometry to diagnose PAD-negative warm autoimmune hemolytic anemia at the Institute of Hematology and Immunology.

**Methods:** An exploratory, cross-sectional, research-development, and technology evaluation study was conducted. Red blood cell suspensions from 72 patients with suspected autoimmune hemolytic anemia were analyzed at the Institute of Hematology and Immunology between 2020 and 2024.

**Results:** Of the 72 samples studied, 35 (48.6%) were female and 37 (51.4%) were male. Autoantibodies were detected in 39 samples, 54.16% of the total studied. Of these, 28 showed fluorescence for the IgG isotype, 8 for the IgM isotype, and 3 for the IgA isotype.

**Conclusions:** Flow cytometry is a tool that provides accurate diagnosis of PAD-negative warm autoimmune hemolytic anemias, which are often challenging for conventional diagnosis.

**Keywords:** flow cytometry; warm autoimmune hemolytic anemias; direct antiglobulin test

Recibido: 14/05/2025

Aceptado: 01/08/2025

## Introducción

Las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) son el resultado de la reducción de la vida media del eritrocito por mecanismos inmunológicos y el incremento de la hemólisis. El cuadro anémico no siempre está presente, ya que la médula ósea tiene la capacidad de aumentar la producción de eritrocitos que compensa la destrucción; lo que resulta en un estado hemolítico sin anemia.<sup>(1)</sup> Se caracteriza por la producción de anticuerpos dirigidos contra los glóbulos rojos propios como consecuencia de la existencia de autoanticuerpos (auto-Ac) dirigidos contra elementos antigénicos de la membrana eritrocitaria. Dado que, en general, los auto-Ac se dirigen contra antígenos de alta incidencia, a menudo también muestran reactividad contra los glóbulos rojos alogénicos. La AHA es un trastorno poco común, con estimaciones de incidencia de 1 a 3 casos por 100 000 por año.<sup>(2,3)</sup> Etiológicamente, se pueden clasificar en AHA secundarias y primarias o idiopáticas.

La AHA de tipo caliente es la más frecuente y aparece, generalmente, después de los 40 años de edad. Las enfermedades que con mayor frecuencia se asocian con AHA son las linfoproliferativas, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la colitis ulcerativa. En este tipo de AHA predominan los anticuerpos de tipo IgG y ocasionalmente IgA.<sup>(4,5,6,7)</sup>

Su incidencia anual es de 1/25 000 - 1/ 80 000 casos/año, aunque es probable que estos datos subestiman su incidencia debido, en parte, a las dificultades en la comprensión de los estudios diagnósticos; por lo que la no disponibilidad de un protocolo definido, origina demoras innecesarias e inexactitudes en la definición del subtipo de la enfermedad y su causa. <sup>(5,6,7,8)</sup>

La prueba de antiglobulina directa (PAD) mediante la técnica en tubo o prueba de Coombs directa es el método más comúnmente utilizado y la prueba de referencia para el diagnóstico de AHAI. Sin embargo, una PAD negativa no excluye el diagnóstico de esta enfermedad, ya que entre el 2 y el 10 % de los pacientes con las características clínicas de AHAI, exhiben una PAD negativa. El diagnóstico de AHAI PAD negativa se basa en el método de exclusión de otras posibles causas. Estos factores incluyen: la existencia de inmunoglobulina G (IgG) unida a glóbulos rojos en niveles demasiado bajos para ser detectados con los métodos estándar; la unión relativamente débil de la IgG; la falta de un eluido positivo por los métodos estándares y; la presencia de inmunoglobulina A(IgA) unida a glóbulos rojos. En un intento de aumentar la sensibilidad de la PAD, se ha iniciado el uso de la citometría de flujo en el diagnóstico de AHAI, aunque aún no se realiza de forma rutinaria. <sup>(7-10)</sup>

La citometría de flujo, es una técnica de gran sensibilidad y especificidad que puede contribuir al diagnóstico eficaz de los pacientes con niveles bajos de auto-Ac. Sus principales ventajas son la rapidez, el número de parámetros evaluables, la sensibilidad y la capacidad de cuantificar un gran número de células para un criterio particular. <sup>(9, 10,11,12)</sup> Este trabajo tiene como objetivo aplicar la técnica de citometría de flujo al diagnóstico de las anemias hemolíticas autoinmunes caliente con PAD negativa en el Instituto de Hematología e Inmunología.

## Métodos

Se realizó un estudio exploratorio, transversal de tipo investigación desarrollo y evaluación de tecnología. La información se obtuvo a partir de la revisión de las órdenes de estudio de AHAI de pacientes con sospecha de anemia recibidas en el

Laboratorio de Inmunohematología del Instituto de Hematología e Inmunología durante el período 2020-2024.

La muestra quedó conformada por 72 muestras de sangre de pacientes con sospecha de AHAI caliente con PAD negativa seleccionadas por muestreo no probabilístico intencional. Se incluyeron todos los pacientes que potencialmente presentan sospechas de AHAI caliente con PAD negativa. Se excluyeron aquellos con PAD negativa y la técnica de elución positiva.

Para la citometría de flujo se seleccionaron los valores de voltaje que permitieron situar la población de eritrocitos en la región inferior izquierda del *dotplot* FSC-SCC, correctamente separados de los detritos celulares. Se trabajó con suspensiones al 1, 2 y 3 % de muestras de sangre total con anticoagulante EDTA; con diferentes concentraciones de los reactivos de detección (anti-IgM, IgG, IgA conjugada con FITC, anti-IgM conjugada con FITC, anti-IgA conjugada con FITC y fracción (Fab)2 de anti-IgG humano obtenida en conejos conjugada con FITC), se escogió la menor concentración que produjo una señal adecuada. Todos los reactivos fueron de la marca DAKO. Se utilizó el reactivo hemoclasificador anti-D (LABEX, Santiago de Cuba), como control positivo para la IgM; y el suero de una embarazada aloinmunizada con un título de anticuerpos anti-D mayor que 16, como control de la IgG; ambos se enfrentaron mediante prueba antiglobulina indirecta (PAI) a una célula O positivo conocida. Para el control negativo se utilizaron células O positivo sin marcar.

La suspensión de eritrocitos donde se obtuvo una señal adecuada de marcaje fue del 1 %, con una dilución del reactivo en PBS de 1/5 y se consideró como un resultado positivo un porcentaje de dispersión de la fluorescencia hacia la derecha del gráfico igual o superior a la media más tres desviaciones estándar de los controles negativos.

Las variables que se tuvieron en cuenta para el estudio fueron: sexo, edad, grupo ABO y RhD para las que se determinaron las frecuencias absolutas y relativas.

La investigación cumplió con los principios de la Declaración de Helsinki para la investigación en seres humanos <sup>(13)</sup> y para su realización contó con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación y el Consejo Científico de la institución.

## Resultados

De las 72 muestras estudiadas, 35 (48,6 %) correspondían al sexo femenino y 37 (51,4 %) al masculino. El número de muestras correspondientes a los pacientes adultos fue de 68 (94,4 %), edades entre 39 a 70 años, y una edad promedio de 56,2 años. Solo 4 (5,6 %) muestras pertenecieron a la edad pediátrica (tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución según edad y sexo de los pacientes con anemia hemolítica autoinmune caliente con prueba de Coombs negativas en el Instituto de Hematología e Inmunología, 2020 - 2024

Variable		Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Total
Sexo	Femenino	35	48,6%	72 (100 %)
	Masculino	37	51,4%	
Edad (años)	1-18	4	5,6%	72 (100 %)
	19-70	68	94,4%	

Se detectaron auto-Ac por citometría de flujo en 39 muestras (54,16 %). De ellas, 28 presentaron fluorescencia para el isotipo IgG, 8 para el isotipo IgM y 3 para el isotipo IgA.

En relación con el grupo ABO se observó una mayor prevalencia del grupo O (n=31), seguido por el grupo A (n=20), B (n=18) y AB (n=3). Para el antígeno D del sistema Rh se encontró un mayor número de muestras RhD positivas (n=68) con respecto a las muestras RhD negativas (n=4); todas las muestras donde se detectaron auto-Ac mediante citometría de flujo resultaron ser Rh D positivas.

Se detectaron anticuerpos en 39 muestras (54,16 % del total estudiado); de ellas, 28 presentaron fluorescencia para el isotipo IgG, 8 para el isotipo IgM y 3 para el isotipo

IgA. El resto de las muestras analizadas fueron negativas, por lo que no fueron válidas para el estudio ya que no presentan anemia por auto-Ac

## Discusión

Las AHAI se caracterizan principalmente por la hemólisis asociada a la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgG, IgM e IgA o fragmentos del sistema del complemento que opsonizan la membrana de los eritrocitos.

El diagnóstico de las AHAI se realiza teniendo en cuenta la condición clínica del paciente, la positividad de la prueba de Coombs directa y la detección de (auto-Ac) presentes en el suero del paciente. Muchos autores plantean que a mayor intensidad de aglutinación de la PAD mayor es el grado de destrucción de los glóbulos rojos;<sup>(2)</sup> sin embargo, se ha demostrado una pobre relación entre la intensidad de la aglutinación y la hemólisis.<sup>(2,3,4)</sup>

Los glóbulos rojos opsonizados por auto-Ac calientes son secuestrados y fagocitados por los macrófagos, principalmente en el bazo. Los macrófagos expresan en su superficie receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas, lo que permite una captura y fagocitosis de los glóbulos rojos opsonizados. En ocasiones la fagocitosis es incompleta y resulta en la formación de esferocitos; esto ha sido explicado por la remoción de más membrana que volumen.<sup>(2)</sup> Además, las ectoenzimas en la superficie del macrófago causan microperforaciones en la membrana del eritrocito, lo que incrementa su permeabilidad. De esta manera propicia la transición de una forma bicóncava de la célula a una forma esférica, y lo hace más propensos a la destrucción, durante el paso a través del bazo. Esto se relaciona con la gravedad de la hemólisis con la esferocitosis, pero no con la intensidad de la aglutinación.<sup>(12,13,14,15)</sup>

A principios de la década de 1970, se enfatizó en que la cantidad de anticuerpos encontrada en los eritrocitos de pacientes con AHAI puede ser insuficiente para detectarlos con reactivos para técnicas convencionales. Se propuso que la distribución de los anticuerpos IgG en los glóbulos rojos circulantes no era uniforme.

Los eritrocitos acumulan IgG a medida que envejecen, lo que da lugar a una mayor proporción de IgG en los eritrocitos más viejos en comparación con los más jóvenes. (10,11)

Alrededor del 3–10 % de los pacientes con una AHAI por anticuerpos calientes presentan una PAD negativa. Por lo que, a pesar de que la PAD es la técnica clave para el diagnóstico; esta no es totalmente sensible, ya que otras variables influyen en su negatividad o positividad como el rango de detección del reactivo poliespecífico antiglobulina humana o el tipo de inmunoglobulina presente. Por ello, en ocasiones, se obtiene un resultado de laboratorio negativo, a pesar de la clínica el paciente presente manifestaciones propias de la enfermedad.

Una mayor complejidad para interpretar correctamente la PAD reside en la capacidad de los auto-Ac para activar el complemento. Las IgM son potentes activadores de la vía clásica del complemento. Sin embargo, pueden desprenderse de la célula durante los procedimientos de lavado o incluso *in vivo*, y dar un resultado negativo. En este caso, las fracciones del complemento (principalmente C3d) permanecen en la superficie de los eritrocitos, lo que permite una PAD positiva con antiseros anticomplemento.

En un intento de aumentar la sensibilidad de la PAD en tubo, se ha introducido la técnica de citometría de flujo, aunque todavía no se utiliza de forma rutinaria en el diagnóstico de AHAI. En un estudio de la Universidad de Cataluña reportaron que 5 de 50 AHAI PAD negativas en tubo, diagnosticadas clínicamente, fueron positivas por citometría de flujo. Los autores también abordaron la cuestión del valor de corte del nivel de IgG unida a los glóbulos rojos, que se desarrolló con más detalle en un estudio más reciente. Por su parte, en un estudio del año 2023 se evaluaron 64 pacientes con AHAI PAD negativas y demostraron una sensibilidad del 71,4 % y una especificidad del 87,8 % con respecto a la técnica convencional en tubo. Además, la detección mediante este método permite descubrir anticuerpos IgM calientes unidos a los glóbulos rojos, que no pueden ser revelados por los métodos estándar y pueden causar AHAI grave. (14,15,16) Por esta razón, cada vez se utilizan técnicas más



sensibles, como la citometría de flujo, para caracterizar las inmunoglobulinas unidas a los glóbulos rojos debido a su mayor precisión, reproducibilidad y sensibilidad.

Con respecto al sexo, los resultados del presente estudio no coinciden con la literatura, donde se reporta que la AHAI es más frecuente en mujeres que hombres, esto puede deberse a la casuística obtenida en el período de estudio.

Según la literatura la AHAI caliente aparece generalmente después de los 40 años y su incidencia aumenta con la edad debido a su relación con las enfermedades linfoproliferativas. Predomina en los adultos donde la enfermedad es más grave, dato que coincide con los resultados del estudio; y requiere de tratamiento inmunosupresor a largo plazo.<sup>(6)</sup>

La frecuencia de muestras positivas por citometría de flujo para IgG, coincide con lo planteado en la literatura.<sup>(15)</sup> Los autores coinciden en que hasta en el 90 % de los pacientes con AHAI presentan anticuerpos anti-IgG. Además, en ellos se detecta el fragmento C3b del complemento. <sup>(14,15,16)</sup> Ambos mecanismos contribuyen a la hemólisis pues los eritrocitos recubiertos con IgG se destruyen en el bazo y los opsonizados por C3 son secuestrados en hígado y en bazo. Los macrófagos del hígado con receptores para el fragmento C3b no son eficientes en la destrucción de eritrocitos con C3b unido sin IgG. Estos macrófagos inmovilizan los eritrocitos a través de los receptores para C3b y posteriormente deben atrapar las células por el receptor para el fragmento Fc de la IgG.<sup>(15)</sup>

Por otra parte, aunque el isotipo de inmunoglobulina predominante es del tipo IgG, se detecta con menor frecuencia inmunoglobulinas de las clases IgA e IgM. Las investigaciones previas informan que la identificación de auto-Ac IgG acompañados de auto-Ac IgA, IgM o de ambas inmunoglobulinas es la causa principal de la gravedad de la hemólisis autoinmune. <sup>(15,16,17)</sup>

En el 14 % de las AHAI por anticuerpos calientes el anticuerpo que está presente en los hematíes es de la clase IgA. El mecanismo por el cual ocurre la destrucción de los hematíes por esta inmunoglobulina, es similar al que ocurre cuando están presentes anticuerpos de la clase IgG, lo que podría explicar las similitudes clínicas

entre las AHAI mediadas por estos auto-AC. <sup>(2,3,4,5,6)</sup> Algunos estudios sugieren que los auto-Ac pueden ser capaces de activar el complemento, aunque esto aún es un tema poco definido. <sup>(7,8,9)</sup>

Los auto-Ac de la clase IgM, generalmente son responsables de la variante fría de las AHAI ya que presentan una temperatura óptima de reacción de 4°C, que causa hemólisis intravascular y en menor medida hemólisis extravascular asociado a C3d. Sin embargo, la amplitud térmica de reacción de estos anticuerpos puede variar de 0 a 34°C, por lo que también puede estar asociado a formas graves de AHAI por anticuerpos calientes, sobre todo si se encuentra concomitando con una IgA. <sup>(2,3,4,5,6)</sup> Según la literatura, en las variantes de AHAI por anticuerpos calientes donde la IgM no sea detectada por la PAD, podría estar presente una IgM monomérica incapaz de activar el sistema del complemento, lo cual impide su detección con el suero poliespecífico antiglobulina humana, que contiene anti-IgG y anti-C3. <sup>(8)</sup>

En relación con el grupo ABO, el predominio del grupo O, no se ha relacionado con la predisposición a padecer AHAI o a cursar formas graves de la enfermedad; pero si se relaciona con la frecuencia fenotípica de la población cubana debido al gran mestizaje con la que esta cuenta. <sup>(18)</sup>

Según lo planteado en la literatura los auto-Ac calientes que provocan AHAI reconocen a los Ag del sistema Rh, elemento que coincide con lo obtenido en el estudio pues todas las muestras positivas mediante citometría de flujo son RhD positivas. En particular, el Ag RhD es una diana común, tanto para respuestas inmunes autoagresivas como convencionales, por lo que es el auto-Ag utilizado para la caracterización de los defectos en los mecanismos de tolerancia en diferentes individuos. Hasta este momento, el sistema de grupo sanguíneo Rh no se ha detectado en otro tipo celular, por lo que es específico de los eritrocitos. Este sistema es un complejo molecular formado por el ensamblaje de la proteína Rh en asociación directa con el sistema RhAG, imprescindible para la expresión de la Ag Rh. <sup>(2,18)</sup>

Este estudio demuestra que la citometría de flujo es una herramienta que proporciona certeza en el diagnóstico de las AHAI caliente PAD negativa, la que usualmente es un desafío para el diagnóstico clásico.

## Referencias bibliográficas

1. Loria mini M, Cserti-Gazdewich C, Branch DR. Autoimmune Hemolytic Anemias: Classifications, Pathophysiology, Diagnoses and Management. *Int J Mol Sci.* 2024;25(8):4296. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25084296>
2. Soler Noda G. Anemia hemolítica autoinmune: mecanismos de inducción de autoinmunidad e inmunobiología. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2022 [citado 15/01/25];38(4):e1724. Disponible en: <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1724>
3. Bandikatla S, Zhang Y, Jaglal M. Autoimmune Hemolytic Anemia. In: Sokol L., Zhang L. (eds) *Non-Neoplastic Hematologic Disorders*. Springer, Cham; 2024. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-62373-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-031-62373-8_16)
4. Alfonso Valdés ME, Bencomo Hernández A, Espinosa Martínez E, Guerrero Calderón R, Guerra Borrego E, Guerrero Calderón AI. Caracterización de pacientes adultos con anemia hemolítica autoinmune atendidos en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2009 [citado 20/03/25]; 25(3):. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892009000300005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892009000300005&lng=es).
5. Zantek N, Koepsell S, Tharp Jr D, Cohn C. The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol.* 2012. 87:707-9. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajh.23218>.
6. Soler Noda G. Anemia hemolítica autoinmune caliente y eriptosis. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2022 [citado 16/09/23];38(1). Disponible en: <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1679>

7. Vasilchenkova PI, Galtseva IV, Lukina E A. Autoimmune hemolytic anemia: the current state of the issue. *Oncohematol.* 2023;18(2):60-7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-2-60-67>.
8. Scheckel CJ, Go RS. Autoimmune Hemolytic Anemia: Diagnosis and Differential Diagnosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022;36(2):315-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.12.001>.
9. Ascoli Bartoli T, Lepore L, D'Abramo A, Adamo G, Corpolongo A, Scorzolini L, et al. Systematic analysis of direct antiglobulin test results in post-artesunate delayed haemolysis. *Malar J.* 2021;20(1):206. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03735-w>.
10. Rodberg K. DAT-Negative Autoimmune Hemolytic Anemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022;36(2):307-313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.11.004>.
11. Roumier M, Loustau V, Guillaud C, Languille L, Mahevas M, Khellaf M, et al. Characteristics and outcome of warm autoimmune hemolytic anemia in adults: New insights based on a single-center experience with 60 patients. *Am J Hematol.* 2014;89(9):E150-5. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajh.23767>.
12. Chaudhary R, Das SS. Application of flow cytometry in transfusion medicine: The Sanjay Gandhi Post Graduate Institute of Medical Sciences, India experience. *Asian J Transfus Sci.* 2022;16(2):159-66. DOI: [https://doi.org/10.4103/ajts.ajts\\_61\\_22](https://doi.org/10.4103/ajts.ajts_61_22).
13. World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Participants. *JAMA.* 2024;23(18):e21972. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2024.21972>.
14. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test. [Updated 2022 Sep 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. [citado 20/03/25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>
15. Barcellini W, Fattizzo B. Strategies to overcome the diagnostic challenges of autoimmune hemolytic anemias. *Expert Rev Hematol.* 2023;16(7):515-24. DOI: <https://doi.org/10.1080/17474086.2023.2216930>.

16. Barcellini W, Fattizzo B. Autoimmune Hemolytic Anemias: Challenges in Diagnosis and Therapy. *Transfus Med Hemother*. 2024 27;51(5):321-31. DOI: <https://doi.org/10.1159/000540475>.
17. Fayek MH, Saad AA, Eissa DG, Tawfik LM, Kamal G. Role of gel test and flow cytometry in diagnosis of Coombs' negative autoimmune haemolytic anaemia. *Int J Lab Hematol*. 2012;34:311-9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2011.01397>.
18. Soler Noda G, Romero Díaz Y, González Díaz I, Forrellat Barrios M, Lam Díaz RM, Cabrera Carballosa CC, et al . Infección por SARS-CoV-2 y grupos sanguíneos en pacientes cubanos diagnosticados con la COVID-19. *Rev Cuba Med*. 2023 [citado 20/09/24]; 62(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232023000200006&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232023000200006&lng=es).

### **Declaración de conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

### **Contribución de autoría**

*Conceptualización:* Yisenia Romero Díaz, Mariela Forrellat Barrios

*Curación de datos:* Yisenia Romero Díaz, Alexis Morán Fernández

*Análisis formal:* Yisenia Romero Díaz, Mariela Forrellat Barrios, Alexis Morán Fernández.

*Investigación* Yisenia Romero Díaz, Mariela Forrellat Barrios

*Metodología:* Yisenia Romero Díaz

*Validación:* Yisenia Romero Díaz

*Redacción – borrador original:* Yisenia Romero Díaz, Mariela Forrellat Barrios, Alexis Morán Fernández

*Redacción – revisión y edición:* Yisenia Romero Díaz, Mariela Forrellat Barrios

